

13/7/1

DIALOG(R) File 351:Derwent WPI

(c) 2000 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

007921469

WPI Acc No: 1989-186581/198926

High yield microbial bishomo-gamma linolenic acid prodn. - by growing
arachidonic acid producing fungus in medium contg. .g. sesame or peanut
oil

Patent Assignee: SUNTORY LTD (SUNR)

Inventor: AKIMOTO K; SHIMIZU S; SHINMEN Y; YAMADA H

Number of Countries: 016 Number of Patents: 008

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
EP 322227	A	19890628	EP 88312144	A	19881221	198926 B
JP 1243992	A	19890928	JP 8853642	A	19880309	198945
US 4916066	A	19900410	US 88286856	A	19881220	199020
CA 1316861	C	19930427	CA 586311	A	19881219	199322
EP 322227	B1	19950628	EP 88312144	A	19881221	199530
DE 3854080	G	19950803	DE 3854080	A	19881221	199536
			EP 88312144	A	19881221	
ES 2074053	T3	19950901	EP 88312144	A	19881221	199541
JP 2746371	B2	19980506	JP 8853642	A	19880309	199823

Priority Applications (No Type Date): JP 8853642 A 19880309; JP 87321551 A
19871221

Abstract (Basic): JP 9135696 A

Preparation of arachidonic acid comprises culturing a *Mortierella* microorganism capable of producing the acid in a medium containing at least 1 of fatty acids, fatty acid salts and fats and oils to produce the acid or lipid containing the acid and collecting the acid.

Also claimed is preparation of lipid containing the acid which comprises culturing a *Mortierella* microorganism capable of producing the acid in a medium containing at least 1 of fatty acids, fatty acid salts and fats and oils and collecting the lipid containing the acid.

ADVANTAGE - The process is simple, uses cheap medium and achieves a high yield. Preferred microorganisms include *M. elongata* IFO 8570, *M. exigua* No.1239, Biko-Ken.

In an example, *M. elongata* SAM 0219 (FERM BP-1239) was inoculated in a sterilised medium of pH 6.0 containing 5% glucose, 0.5% peptone, 0.3% yeast extract and 0.3% malt extract and cultured with shaking in a recipro-shaker at 28 deg.C for 5 days. After culture, the cell was collected by filtration, washed thoroughly with water and freezing-dried to obtain 1.3g of the cell. The cell was extracted with a chloroform-methanol-water mono-layer system by the Bligh and Dyer extraction to obtain 320 mg. lipid. The lipid was treated with a 95:5 anhydrous methanol-HCl system at 20 deg.C for 3 hours, to esterify the acid into methyl arachidonate. The ester was separated by column chromatography to obtain the fraction of the arachidonate. After distillation of the solvent by rotary evaporation 25 mg. of the pure arachidonate.

Dwg.0/0

Derwent Class: B05; D16; E17

International Patent Class (Main): C12P-007/40; C12P-007/64

International Patent Class (Additional): C12P-007/64; C12R-001-645;

C12P-007/40

?s pn=(jp 1243992 or jp 89243992) or an=89jp-243992

1 PN=JP 1243992

0 PN=JP 89243992

0 AN=89JP-243992

S13

1 PN=(JP 1243992 OR JP 89243992) OR AN=89JP-243992

?t 13/7

Cited Patents: 1.Jnl.Ref; A3...9029; EP 252716; FR 2574089; JP 61177990;
No-SR.Pub

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
-----------	------	-----	----	----------	--------------

EP 322227	A	E	14		
-----------	---	---	----	--	--

Designated States (Regional): AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

US 4916066	A		12		
------------	---	--	----	--	--

EP 322227	B1	E	20	C12P-007/64	
-----------	----	---	----	-------------	--

Designated States (Regional): AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

DE 3854080	G			C12P-007/64	Based on patent EP 322227
------------	---	--	--	-------------	---------------------------

ES 2074053	T3			C12P-007/64	Based on patent EP 322227
------------	----	--	--	-------------	---------------------------

JP 2746371	B2		13	C12P-007/40	Previous Publ. patent JP 1243992
------------	----	--	----	-------------	----------------------------------

CA 1316861	C			C12P-007/64	
------------	---	--	--	-------------	--

Abstract (Basic): EP 322227 A

Prodn. of bishomo-gamma-linolenic acid (I; cis-8, 11, 14-eicosatrienoic acid) or a lipid (Ia) contg. it, comprises culturing a microorganism able to produce arachidonic acid (II) in a medium contg., as additive, sesame oil and/or peanut oil. Alternatively, the additive is added to a medium in which the microorganism has been grown, then the culture continued.

In a modification the additive is an extract of sesame oil; sesamin; sesaminol; episesamin; episesaminol; sesamolin; 2-A-6-(3-methoxy-4-hydroxyphenyl)-, 2,6-bis(3-methoxy-4-hydroxyphenyl- or 2-A-6-(3-methoxy-4-hydroxyphenoxy)-3,7-dioxabicyclo (3,3,0)octane (A = 3,4-methylene dioxyphehyl); or extracts of tarragon, dill seed, parsley, turmeric and/or nutmeg.

ADVANTAGE - High yields of (I) are produced on inexpensive media.

0/3

Abstract (Equivalent): EP 322227 B

A process for making bishomo-gamma-linolenic acid or a lipid containing bishomo-gamma-linolenic acid, in which a microorganism capable of producing arachidonic acid is cultured in a culture medium with an additive which is sesame oil and/or peanut oil.

Dwg.0/3

Abstract (Equivalent): US 4916066 A

Bis-homo-gamma-linolenic acid is produced by (a) culturing a microorganism which can form arachidonic acid in a culture medium contg. sesame oil and/or peanut oil as additive to form prod. (or lipid contg. it); or (b) adding additive to culture medium in which microorganism has been grown, then further culturing to form prod.

Microorganism comprises e.g. Mortierella elongata IFO 8570, M. exiquo IFO 8571, M. hygrophila IFO 5941, M. alpina IFO 8568, etc.

ADVANTAGE - Process is efficient using an inexpensive culture medium. (12pp)

Derwent Class: B05; D16

International Patent Class (Main): C12P-007/40; C12P-007/64

International Patent Class (Additional): C12R-001/64; C12P-007/40;

C12R-001-645; C12R-001-66; C12R-001-77; C12R-001-785; C12R-001-80

?map anpryy temp s13

1 Select Statement(s), 2 Search Term(s)

Serial#TD431

?exs

Executing TD431

1 AN=JP 87321551

1 AN=JP 8853642

S14 1 AN=JP 87321551 + AN=JP 8853642

?s s14 not s13

1 S14

1 S13

S15 0 S14 NOT S13

?s pn=(jp 8214893 or jp 96214893) or an=96jp-214893

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平1-243992

⑬ Int. Cl.

C 12 P 7/40

識別記号

庁内整理番号

6926-4B※

⑭ 公開 平成1年(1989)9月28日

審査請求 未請求 請求項の数 8 (全17頁)

⑮ 発明の名称 ビスホモマーリーノレン酸及びこれを含有する脂質の製造方法

⑯ 特 願 昭63-53642

⑰ 出 願 昭63(1988)3月9日

優先権主張 ⑱ 昭62(1987)12月21日 ⑲ 日本(JP) ⑳ 特願 昭62-321551

㉑ 発 明 者 秋 元 健 吾 大阪府三島郡島本町広瀬1-12-22
 ㉒ 発 明 者 新 免 芳 史 京都府乙訓郡大山崎町円明寺鳥居前8-1-S-304
 ㉓ 発 明 者 山 田 秀 明 京都府京都市左京区松ヶ崎木ノ本町19-1
 ㉔ 発 明 者 清 水 昌 京都府京都市中京区西の京伯楽町14
 ㉕ 出 願 人 サントリー株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号
 ㉖ 代 理 人 弁理士 青 木 朗 外4名

最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

ビスホモマーリーノレン酸及びそれを含有する脂質の製造方法

2. 特許請求の範囲

1. アラキドン酸生産能を有する微生物を胡麻油及び／又は落花生油を添加した培地で培養するか、あるいは該微生物が培養されている培養液に胡麻油及び／又は落花生油を添加してさらに培養することによりビスホモマーリーノレン酸又はビスホモマーリーノレン酸を含有する脂質を生成せしめ、そしてビスホモマーリーノレン酸を採取することを特徴とするビスホモマーリーノレン酸の製造方法。

2. アラキドン酸生産能を有する微生物を胡麻油及び／又は落花生油を添加した培地で培養するか、あるいは該微生物が培養されている培養液に胡麻油及び／又は落花生油を添加してさらに培養し、そしてビスホモマーリーノレン酸を含有する脂質を採取することを特徴とするビスホモマー

リーノレン酸を含有する脂質の製造方法。

3. 胡麻油に対して実質的に非混和性である有機溶剤により胡麻油から抽出した抽出物又は胡麻種子の溶剤抽出物を添加した培地でアラキドン酸生産能を有する微生物を培養するか、あるいは該微生物が培養されている培養液に前記抽出物を添加してさらに培養することによりビスホモマーリーノレン酸又はビスホモマーリーノレン酸を含有する脂質を生成せしめ、そしてビスホモマーリーノレン酸を採取することを特徴とするビスホモマーリーノレン酸の製造方法。

4. 胡麻油に対して実質的に非混和性である有機溶剤により胡麻油から抽出した抽出物又は胡麻種子の溶剤抽出物を添加した培地でアラキドン酸生産能を有する微生物を培養するか、あるいは該微生物が培養されている培養液に前記抽出物を添加してさらに培養し、そしてビスホモマーリーノレン酸を含有する脂質を採取することを特徴とするビスホモマーリーノレン酸を含有する脂質の製造方法。

5. アラキドン酸生産能を有する微生物をセサミン、セサミノール、エビセサミン、エビセサミノール、セサモリン、2-(3,4-メチレンジオキシフェニル)-6-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニル)-3,7-ジオキサビシクロ(3,3,0)オクタン、2,6-ビス-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニル)-3,7-ジオキサビシクロ(3,3,0)オクタン、又は2-(3,4-メチレンジオキシフェニル)-6-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェノキシ)-3,7-ジオキサビシクロ(3,3,0)オクタンを単独で又は組み合わせで添加した培地で培養するか、あるいは該微生物が培養されている培養液にセサミン、セサミノール、エビセサミン、エビセサミノール、セサモリン、2-(3,4-メチレンジオキシフェニル)-6-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニル)-3,7-ジオキサビシクロ(3,3,0)オクタン、2,6-ビス-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニル)-3,7-ジオキサビシクロ(3,3,0)オク

タン、又は2-(3,4-メチレンジオキシフェニル)-6-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェノキシ)-3,7-ジオキサビシクロ(3,3,0)オクタンを単独で又は組み合わせで添加してさらに培養することによりビスホモ-γ-リノレン酸又はビスホモ-γ-リノレン酸を含有する脂質を生成せしめ、そしてビスホモ-γ-リノレン酸を採取することを特徴とするビスホモ-γ-リノレン酸の製造方法。

6. アラキドン酸生産能を有する微生物をセサミン、セサミノール、エビセサミン、エビセサミノール、セサモリン、2-(3,4-メチレンジオキシフェニル)-6-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニル)-3,7-ジオキサビシクロ(3,3,0)オクタン、2,6-ビス-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニル)-3,7-ジオキサビシクロ(3,3,0)オクタン、又は2-(3,4-メチレンジオキシフェニル)-6-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェノキシ)-3,7-ジオキサビシクロ(3,3,0)オク

タンを単独で又は組み合わせで添加した培地で培養するか、あるいは該微生物が培養されている培養液にセサミン、セサミノール、エビセサミン、エビセサミノール、セサモリン、2-(3,4-メチレンジオキシフェニル)-6-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニル)-3,7-ジオキサビシクロ(3,3,0)オクタン、2,6-ビス-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニル)-3,7-ジオキサビシクロ(3,3,0)オクタン、又は2-(3,4-メチレンジオキシフェニル)-6-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェノキシ)-3,7-ジオキサビシクロ(3,3,0)オクタンを単独で又は組み合わせで添加してさらに培養し、そしてビスホモ-γ-リノレン酸を含有する脂質を採取することを特徴とするビスホモ-γ-リノレン酸を含有する脂質の製造方法。

7. アラキドン酸生産能を有する微生物をタラゴン(Tarragon)、イノンド種子(Dill Seed)、パセリ(Parsley)、ウコン(Turmeric)、又はナツメグ(Nutmeg)を単独で又は組み合わせで添加した培

地で培養するか、あるいは該微生物が培養されている培養液にタラゴン(Tarragon)、イノンド種子(Dill Seed)、パセリ(Parsley)、ウコン(Turmeric)、又はナツメグ(Nutmeg)を単独で又は組み合わせで添加してさらに培養することによりビスホモ-γ-リノレン酸又はビスホモ-γ-リノレン酸を含有する脂質を生成せしめ、そしてビスホモ-γ-リノレン酸を採取することを特徴とするビスホモ-γ-リノレン酸の製造方法。

8. アラキドン酸生産能を有する微生物をタラゴン(Tarragon)、イノンド種子(Dill Seed)、パセリ(Parsley)、ウコン(Turmeric)、又はナツメグ(Nutmeg)を単独で又は組み合わせで添加した培地で培養するか、あるいは該微生物が培養されている培養液にタラゴン(Tarragon)、イノンド種子(Dill Seed)、パセリ(Parsley)、ウコン(Turmeric)、又はナツメグ(Nutmeg)を単独で又は組み合わせで添加してさらに培養し、そしてビスホモ-γ-リノレン酸を含有する脂質を採取することを特徴とするビスホモ-γ-リノレン酸を含有

有する脂質の製造方法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明はアラキドン酸生産能を有する微生物を利用した醗酵法によるビスホモマーリノレン酸又はそれを含有する脂質の製造方法に関する。

(従来技術)

ビスホモマーリノレン酸(8, 11, 14-エイコサトリエン酸)は魚油、海藻等の構成脂肪酸のひとつとして存在することが知られている。しかしながら、その含量はわずかであるため単離精製品はたいへん高価なものとなっており、生産効率の高い製法の開発が強く望まれている。このためビスホモマーリノレン酸を微生物により製造する方法が種々提案されている。しかしながらその生産効率は必ずしも満足できるものではない。

(発明が解決しようとする課題)

従って本発明は、安価な常用の培地を用いて効

率よく(3, 4-メチレンジオキシフェニル)-6-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニル)-3, 7-ジオキサビシクロ(3, 3, 0)オクタン、2, 6-ビス-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニル)-3, 7-ジオキサビシクロ(3, 3, 0)オクタン、2-(3, 4-メチレンジオキシフェニル)-6-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェノキシ)-3, 7-ジオキサビシクロ(3, 3, 0)オクタン等も有効であることを見出し、これらの知見に基いて本発明を完成した。

従ってこの発明は、アラキドン酸生産能を有する微生物を胡麻油及び/又は、落花生油を添加した培地で培養するか、あるいは該微生物が培養されている培養液に胡麻油及び/又は落花生油を添加してさらに培養することによりビスホモマーリノレン酸又はビスホモマーリノレン酸を含有する脂質を生成せしめ、そしてビスホモマーリノレン酸を採取することの特徴とするビスホモマーリノレン酸の製造方法；及びアラキドン酸生

率よくビスホモマーリノレン酸を製造することができる方法を提供しようとするものである。

(課題を解決するための手段)

本発明者等は、上記の目的を達成するため種々研究した結果、アラキドン酸を生産する能力を有する微生物を、培地または培養中の培養液に胡麻油または落花生油を添加して培養した場合にアラキドン酸の生産が押えられ、その前駆体であるビスホモマーリノレン酸の生産量が増加するという全く新しい知見を得た。

本発明者等はさらに、胡麻油中の有効成分を追求した結果、胡麻油に対して実質的に非混和性である有機溶剤、例えばアセトン、により胡麻油から抽出される抽出物中に有効成分が存在することを見出し、さらにこの抽出物中の有効成分を追求した結果、少なくともセサミン、セサミノール、エビセサミン、エビセサミノール、及びセサモリンが有効成分であることを見出した。本発明者らはさらに、胡麻種子の有機溶剤抽出物から得られ

産能を有する微生物を胡麻油及び/又は落花生油を添加した培地で培養するか、あるいは該微生物が培養されている培養液に胡麻油及び/又は落花生油を添加してさらに培養し、そしてビスホモマーリノレン酸を含有する脂質を採取することの特徴とするビスホモマーリノレン酸を含有する脂質の製造方法を提供しようとするものである。

この発明はさらに、胡麻油に対して実質的に非混和性である有機溶剤により胡麻油から抽出した抽出物又は胡麻種子の溶剤抽出物を添加した培地でアラキドン酸生産能を有する微生物を培養するか、あるいは該微生物が培養されている培養液に前記抽出物を添加してさらに培養することによりビスホモマーリノレン酸又はビスホモマーリノレン酸を含有する脂質を生成せしめ、そしてビスホモマーリノレン酸を採取することの特徴とするビスホモマーリノレン酸の製造方法；並びに前記抽出物を添加した培地でアラキドン酸生産能を有する微生物を培養するか、あるいは該微生物が培養されている培養液に前記抽出物を添加し

てさらに培養し、そしてビスホモ-γ-リノレン酸を含有する脂質を採取することを特徴とするビスホモ-γ-リノレン酸を含有する脂質の製造方法を提供する。

この発明はさらに、アラキドン酸生産能を有する微生物をセサミン、セサミノール、エビセサミン、エビセサミノール、セサモリン、2-(3, 4-メチレンジオキシフェニル)-6-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニル)-3, 7-ジオキサビシクロ(3, 3, 0)オクタン、2, 6-ビス-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニル)-3, 7-ジオキサビシクロ(3, 3, 0)オクタン、又は2-(3, 4-メチレンジオキシフェニル)-6-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェノキシ)-3, 7-ジオキサビシクロ(3, 3, 0)オクタンを単独で又は組み合わせて添加した培地で培養するか、あるいは該微生物が培養されている培養液にセサミン、セサミノール、エビセサミン、エビセサミノール、セサモリン、2-(3, 4-メチレンジオキシフェニル)-6-

(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニル)-3, 7-ジオキサビシクロ(3, 3, 0)オクタン、2, 6-ビス-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニル)-3, 7-ジオキサビシクロ(3, 3, 0)オクタン、又は2-(3, 4-メチレンジオキシフェニル)-6-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェノキシ)-3, 7-ジオキサビシクロ(3, 3, 0)オクタンを単独で又は組み合わせて添加してさらに培養することによりビスホモ-γ-リノレン酸又はビスホモ-γ-リノレン酸を含有する脂質を生成せしめ、そしてビスホモ-γ-リノレン酸を採取することを特徴とするビスホモ-γ-リノレン酸の製造方法；並びにアラキドン酸生産能を有する微生物をセサミン、セサミノール、エビセサミン、エビセサミノール、セサモリン、2-(3, 4-メチレンジオキシフェニル)-6-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニル)-3, 7-ジオキサビシクロ(3, 3, 0)オクタン、2, 6-ビス-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニル)-3, 7-ジオキサビシクロ

(3, 3, 0)オクタン、又は2-(3, 4-メチレンジオキシフェニル)-6-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェノキシ)-3, 7-ジオキサビシクロ(3, 3, 0)オクタンを単独で又は組み合わせて添加した培地で培養するか、あるいは該微生物が培養されている培養液にセサミン、セサミノール、エビセサミン、エビセサミノール、セサモリン、2-(3, 4-メチレンジオキシフェニル)-6-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニル)-3, 7-ジオキサビシクロ(3, 3, 0)オクタン、2, 6-ビス-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニル)-3, 7-ジオキサビシクロ(3, 3, 0)オクタン、又は2-(3, 4-メチレンジオキシフェニル)-6-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェノキシ)-3, 7-ジオキサビシクロ(3, 3, 0)オクタンを単独で又は組み合わせて添加してさらに培養し、そしてビスホモ-γ-リノレン酸を含有する脂質を採取することを特徴とするビスホモ-γ-リノレン酸を含有する脂質の製造方法を提供する。

この発明はさらに、アラキドン酸生産能を有する微生物をタラゴン(Tarragon)、イノンド種子(Dill Seed)、パセリ(Parsley)、ウコン(Turmeric)、又はナツメグ(Nutmeg)を単独で又は組み合わせて添加した培地で培養するか、あるいは該微生物が培養されている培養液にタラゴン(Tarragon)、イノンド種子(Dill Seed)、パセリ(Parsley)、ウコン(Turmeric)、又はナツメグ(Nutmeg)を単独で又は組み合わせて添加してさらに培養することによりビスホモ-γ-リノレン酸又はビスホモ-γ-リノレン酸を含有する脂質を生成せしめ、そしてビスホモ-γ-リノレン酸を採取することを特徴とするビスホモ-γ-リノレン酸の製造方法、並びにアラキドン酸生産能を有する微生物をタラゴン(Tarragon)、イノンド種子(Dill Seed)、パセリ(Parsley)、ウコン(Turmeric)、又はナツメグ(Nutmeg)を単独で又は組み合わせて添加した培地で培養するか、あるいは該微生物が培養されている培養液にタラゴン(Tarragon)、イノンド種子(Dill Seed)、パセリ

(Parsley)、ウコン(Turmeric)、又はナツメグ
(Nutmeg) ^{の抽出液}を単独で又は組み合わせて添加してさら
に培養し、そしてビスホモ-γ-リノレン酸を含有
する脂質を採取することを特徴とするビスホモ
-γ-リノレン酸を含有する脂質の製造方法を提
供する。

(具体的な説明)

本発明においては、アラキドン酸生産能を有する微生物であれば、すべて使用することができる。このような微生物として、例えばモルティエラ属(Mortierella)属、コニディオボラス(Conidiobolus)属、フィチウム(Pythium)属、フィトフトラ(Phytophthora)属、ペニシリウム(Penicillium)属、クラドスポリウム(Cladosporium)属、ムコール(Mucor)属、フザリウム(Fusarium)属、アスペルギルス(Aspergillus)属、ロードトリラ(Rhodotorula)属、エントモフトラ(Entomophthora)属に属する微生物を挙げることができる。モルティエラ属では例えば、モルティエラ・エロン

ガタ(Mortierella elongata)IFO 8570、モルティエラ・エキシグア(Mortierella exigua) IFO 8571、モルティエラ・ヒグロフィラ(Mortierella hygrophila) IFO 5941、モルティエラ・アルピナ(Mortierella alpina) IFO 8568等を挙げることができる。これらの菌株はいずれも、財団法人醗酵研究所からなら制限なく入手することができる。

また、本発明者が土壌から分離した菌株モルティエラ・エロンガタ SAM.0219 (微工研菌寄第8703号)(微工研条寄第1239号)を使用することもできる。

本発明に使用される菌株を培養する為には、その菌株の胞子、菌子、又は予め培養して得られた前培養液を、液体培地又は固体培地に接種し培養する。液体培地の場合に、炭素源としてはグルコース、フラクトース、キシロース、サッカロース、マルトース、可溶性デンプン、糖蜜、グリセロール、マンニトール等の一般的に使用されているものが、いずれも使用できるが、これらに限られる

ものではない。窒素源としてはペプトン、酵母エキス、麦芽エキス、肉エキス、カザミノ酸、コーンスティブリカー等の天然窒素源の他に、尿素等の有機窒素源、ならびに硝酸ナトリウム、硝酸アンモニウム、硫酸アンモニウム等の無機窒素源を用いることができる。この他に必要に応じリン酸塩、硫酸マグネシウム、硫酸鉄、硫酸銅等の無機塩及びビタミン等も微量栄養源として使用できる。これらの培地成分は微生物の成育を害しない濃度であれば特に制限はない。実用上一般に、炭素源は0.1~30重量%、好ましくは1~10重量%、窒素源は0.01~5重量%、好ましくは0.1~2重量%の濃度とするのが良い。

固体培地で培養する場合は、固形物重量に対して50~100重量%の水を加えたみずま、もみから、米ぬか等を用い、5~40℃、好ましくは20~30℃の温度において、3~14日間培養を行う。この場合に必要に応じて培地中に窒素源、無機塩類、微量栄養源を加えることができる。

本発明は、本来アラキドン酸生産能を有する微

生物を、胡麻油又は落花生油、あるいは胡麻油又は落花生油中に含まれる有効成分の存在下で培養することによりビスホモ-γ-リノレン酸を蓄積せしめることを特徴としている。この場合の胡麻油及び落花生油は粗製品でも精製品でもよい。本発明においては、ビスホモ-γ-リノレン酸の蓄積を促進する物質として胡麻油の抽出物を使用することができる。この場合、胡麻油とは実質的に非混和性であり且つ有効成分を抽出・溶解することができる種々の有機溶剤を用いて抽出を行うことができる。このような有機溶剤として、例えばアセトン、メチルエチルケトン、ジエチルケトン、メタノール、エタノール等を挙げることができる。有効成分を含有する抽出物を得るには、例えば胡麻油と上記の溶剤のいずれかとを均一に混合した後、低温において静置し、遠心分離等の常法に従って相分離を行い、溶剤画分から溶剤を蒸発除去することにより得られる。本発明において使用する添加物はまた、胡麻種子からの抽出物であってもよい。この場合、胡麻種子を必要により破砕し

た後、任意の溶剤、例えば胡麻油からの抽出について前記した溶剤を用いて常法により抽出することができる。抽出残渣を分離した後、抽出液から蒸発等により溶剤を除去することにより抽出物が得られる。

本発明によれば、この様にして調製される抽出物中に含まれるセサミン、セサミノール、エビセサミン、エビセサミノール、セサモリン、2-(3,4-メチレンジオキシフェニル)-6-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニル)-3,7-ジオキサビシクロ(3,3,0)オクタン、2,6-ビス-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニル)-3,7-ジオキサビシクロ(3,3,0)オクタン、又は2-(3,4-メチレンジオキシフェニル)-6-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェノキシ)-3,7-ジオキサビシクロ(3,3,0)オクタン等のリグナン類化合物を単独で、又はいずれか2種類以上を組み合わせ使用することもできる。これらはいずれも既知化合物であり商業的に入手することができる。また、

サミン、エビセサミノール等のリグナン類化合物を添加する場合その量(これらの2種類以上を組み合わせ使用する場合はその合計量)は、培地に対して $1 \times 10^{-2} \sim 1 \times 10^{-1}$ 重量%である。これらの添加物類は生産微生物を接種する前又はその直後の培地に加えてもよく、又は培養を開始した後に加えてもよく、あるいは両時点で加えてもよい。培養開始後の添加は1回でもよく、又は複数回に分けて間欠的に添加してもよい。あるいは、連続的に添加することもできる。なお、上記の各種の添加物のほかに、さらにアラキドン酸の生産を上げる油脂、例えば、オリーブ油、大豆油、綿実油、ヤシ油等を使用することもできる。

培養温度は5~40℃、好ましくは20~30℃とし、培地のpHは4~10、好ましくは6~9として通気攪拌培養、振盪培養、又は静置培養を行う。培養は通常2~10日間行う。

このようにして培養して、菌体内にビスホモ-γ-リノレン酸を大量に含有する脂質が生成蓄積される。液体培地を使用した場合には、培養菌体

これらの化合物を胡麻油抽出物から得るためには、前記のようにして得られる抽出物をカラムクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、再結晶、蒸留等の常法に従って処理することにより目的とする化合物を単離すればよい。

この発明の添加物としてはさらに、各種の植物、例えば香辛性植物、例えばタラゴン(Tarragon)、イノンド種子(Dill Seed)、パセリ(Parsley)、ウコン(Turmeric)、ナツメグ(Nutmeg)等からの抽出物、又はこれらから製造された香辛料からの抽出物を使用することができる。これらの抽出物は常用の溶剤、例えばジクロロメタン、エタノール、メタノール、エチルエーテル等を用いて調製することができる。

添加物の量はおおよそ次の通りである。胡麻油又は落花生油、あるいはこの両者の総添加量は培地に対して0.001~10重量%、好ましくは0.5~10重量%である。胡麻油の抽出物を添加する場合、その添加量は培地に対して $3 \times 10^{-2} \sim 3 \times 10^{-1}$ である。また、セサミン、セサミノール、エビセ

から、例えば、次のようにしてビスホモ-γ-リノレン酸の採取を行う。

培養終了後、培養液より遠心分離及び濾過等の常用の固液分離手段により培養菌体を得る。菌体は十分水洗し、好ましくは乾燥する。乾燥は凍結乾燥、風乾等によって行うことができる。乾燥菌体は、好ましくは窒素気流下で有機溶媒によって抽出処理する。有機溶媒としてはエーテル、ヘキサン、メタノール、エタノール、クロロホルム、ジクロロメタン、石油エーテル等を用いることができ、又メタノールと石油エーテルの交互抽出やクロロホルム-メタノール-水の一層系の溶媒を用いた抽出によっても良好な結果を得ることができる。抽出物から減圧下で有機溶媒を留去することにより、高濃度のビスホモ-γ-リノレン酸を含有した脂質が得られる。

また、上記の方法に代えて湿菌体を用いて抽出を行うことができる。メタノール、エタノール等の水に対して相溶性の溶媒、又はこれらと水及び/又は他の溶媒とから成る水に対して相溶性の混

合溶媒を使用する。その他の手順は上記と同様である。

上記のようにして得られた脂質中には、ビスホモ-γ-リノレン酸が脂質化合物、例えば脂肪の構成成分として含まれている。これらを直接分離することもできるが、低級アルコールとのエステル、例えばビスホモ-γ-リノレン酸メチルとして分離するのが好ましい。このようなエステルにすることにより、他の脂質成分から容易に分離することができ、また、培養中に生成する他の脂肪酸、例えばパルミチン酸、オレイン酸、リノール等（これらも、ビスホモ-γ-リノレン酸のエステル化に際してエステル化される）から容易に分離することができる。例えば、ビスホモ-γ-リノレン酸のメチルエステルを得るには、前記の抽出脂質を無水メタノール-塩酸5~10%、BF₃-メタノール10~50%等により、室温にて1~24時間処理するのが好ましい。

前記の処理液からビスホモ-γ-リノレン酸メチルエステルを回収するにはヘキサン、エーテル、

酢酸エチル等の有機溶媒で抽出するのが好ましい。次に、この抽出液を無水硫酸ナトリウム等により乾燥し、有機溶媒を好ましくは減圧下で留去することにより主として脂肪酸エステルからなる混合物が得られる。この混合物中には、目的とするビスホモ-γ-リノレン酸メチルエステルの他に、パルミチン酸メチルエステル、ステアリン酸メチルエステル、オレイン酸メチルエステル等が含まれている。これらの脂肪酸メチルエステル混合物からビスホモ-γ-リノレン酸メチルエステルを単離するには、カラムクロマトグラフィー、低温結晶化法、尿素包接法、液々交流分配クロマトグラフィー等を単独で、又は組み合わせて使用することができる。

こうして単離されたビスホモ-γ-リノレン酸メチルからビスホモ-γ-リノレン酸を得るには、アルカリで加水分解した後、エーテル、酢酸エチル等の有機溶媒で抽出すればよい。

また、ビスホモ-γ-リノレン酸をそのメチルエステルを経ないで採取するには、前記の抽出脂

質をアルカリ分解（例えば5%水酸化ナトリウムにより室温にて2~3時間）した後、この分解液から、脂肪酸の抽出・精製に常用されている方法により抽出・精製することができる。

次に、実施例により、この発明をさらに具体的に説明する。

実施例1

グルコース2.5%及び酵母エキス1%を含む培地（pH6.0）並びにグルコース0.5%、胡麻油2%及び酵母エキス1%を含む培地（pH6.0）2mlをそれぞれねじ口試験管に入れ、120℃で20分間殺菌した。モルティエラ・イサベリナ (*Mortierella isabellina*) IFO 7884、モルティエラ・ビナセア (*Mortierella vinacea*) IFO 7875、モルティエラ・ヒューミコラ (*Mortierella humicola*) IFO 8289、モルティエラ・ナナ (*Mortierella nana*) IFO 8794、モルティエラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) IFO 8568、モルティエラ・エロンガタ (*Mortierella elongata*) IFO 8570、又はモルティエラ・バルビスボラ

(*Mortierella parvispora*) IFO 8574を2種類の培地にそれぞれ1白金耳を接種し、レシプロシェーカー（110rpm）により28℃で6日間振盪培養した。培養後、遠心エバポレーター（60℃、2時間）で乾燥後、各ねじ口試験管に塩化メチレン2ml、無水メタノール-塩酸（10%）2ml加え、キャップした後、50℃で3時間処理することによってメチルエステル化し、n-ヘキサン4ml、水1mlを加え、2回抽出し溶媒を遠心エバポレーター（40℃、1時間）で留去した後、得られた脂肪酸メチルエステルをガスクロマトグラフィーで分析した。この結果を第1表に示す。

以下余白

第 1 表

生産株	生成脂肪酸 γ-リノレン酸 (mg/l)	ビスホモ-γ-リ ノレン酸 (mg/l)	アラキドン酸 (mg/l)
M. イサベリナ	101.6 143.4		
M. ビナセア	122.4 195.4		
M. ヒューミコラ	122.5 215.7		
M. ナナ	195.6 216.8		
M. アルビナ	113.0 276.1	70.7 301.5	617.0 141.7
M. エロンガタ	72.9 160.7	67.2 125.0	430.3 92.5
M. バルビスポラ	116.7 361.9	81.9 398.1	268.2 55.8

上段: グルコース 2.5%, 酵母エキス 1%
下段: グルコース 0.5%, 胡麻油 2%, 酵母エキス 1%

この表から明らかなように、アラキドン酸生産能を有する微生物を胡麻油が含まれる培地で培養することによりアラキドン酸の生産が押えられ、

マトグラフィーで分析した。この結果を第2表に示す。

第 2 表

添加物	生成物	乾燥菌体 (g/l)	ビスホモ-γ-リ ノレン酸 (g/l)	アラキドン酸 (g/l)
油添加なし		17.9	0.43	3.48
落花生油 2%		35.8	0.99	2.26
胡麻油 2%		35.3	1.53	0.92
オリーブ油 2%		35.9	0.51	3.58

第2表から明らかなように、胡麻油及び落花生油を培地に、あるいは培養中の培養液に添加することにより、アラキドン酸の生産が押えられ、ビスホモ-γ-リノレン酸が大量に生産された。又、胡麻油、落花生油以外の油の一例としてオリーブ油を添加したが、ビスホモ-γ-リノレン酸の大量生産は認められなかった。

実施例 3

グルコース 0, 0.5, 1, 2, 3 又は 4%, 酵母エキス 1%, 及び胡麻油 2% を含む培地 (pH

その前駆体であるビスホモ-γ-リノレン酸が大量に生産されることが認められた。なお、得られたビスホモ-γ-リノレン酸については質量分析、NMR 分析等により同定された。

実施例 2

グルコース 4%, 酵母エキス 1% 及び胡麻油 2% を含む培地 (pH 6.0)、グルコース 4%, 酵母エキス 1% 及び落花生油 2% を含む培地 (pH 6.0)、グルコース 4%, 酵母エキス 1% 及びオリーブ油 2% を含む培地 (pH 6.0)、並びにグルコース 4% 及び酵母エキス 1% を含む培地 (pH 6.0) 4 ml を 20 ml のエルレンマイヤーフラスコに入れ、120℃ で 20 分間殺菌した。モルティエラ・アルビナ IF0 8568 の胞子液 200 μl をそれぞれの培地に加え、レシプロシェーカー (110rpm) により 28℃ で 8 日間振盪培養した。培養後、濾過により菌体を回収し、十分水洗した後、遠心エバポレーター (60℃、2 時間) で乾燥させ、そして実施例 1 と同様に加水分解、メチルエステル化及び抽出を行い、得られた脂肪酸メチルエステルをガスクロ

6.0)、並びにグルコース 4%, 酵母エキス 1% 及び胡麻油 0.1, 2 又は 3% を含む培地 (pH 6.0) 10 ml を 50 ml のエルレンマイヤーフラスコに入れ、120℃ で 20 分間殺菌した。モルティエラ・アルビナ IF0 8568 の胞子液 250 μl をそれぞれの培地に加え、レシプロシェーカー (110rpm) により 28℃ で 7 日間振盪培養した。培養後、実施例 1 と同様に濾過、水洗、乾燥、加水分解、メチルエステル化、及び抽出を行い、得られた脂肪酸メチルエステルをガスクロマトグラフィーで分析した。第1図にその結果を示す。グルコースが増すとアラキドン酸が大量に生産され、それが胡麻油の添加により押えられ、前駆体のビスホモ-γ-リノレン酸が大量に生産されることが認められた。

実施例 4

グルコース 5%, 酵母エキス 1% 及び胡麻油 2% を含む培地 (pH 6.0) 100 ml を 500 ml エルレンマイヤーフラスコに入れ、120℃ で 20 分間殺菌した。モルティエラ・アルビナ IF0 8568 の胞子

液 2.5 ml を加え、レシプロシェーカー (110rpm) により 28℃ で 7 日間振盪培養した。実施例 1 と同様に濾過、水洗、乾燥、加水分解、メチルエステル化、及び抽出を行い、混合脂肪酸メチルエステル 12.0 g を得た。このもののビスホモ-γ-リノレン酸メチル含量は 9.3 %、生成量は培地当たり 2.23 g / l、乾燥菌体当たり 55.8 mg / g であった。また、この時のアラキドン酸メチル含量は 6.6 %、生成量は培地当たり 1.58 g / l、乾燥菌体当たり 39.4 mg / g であった。

実施例 5

グルコース 4 %、酵母エキス 1 % 及び胡麻油 1 % を含む培地 (pH 6.0)、並びにグルコース 4 % 及び酵母エキス 1 % を含む培地 (pH 6.0) 2 ml を 10 ml のエルレンマイヤーフラスコに入れ、120℃ で 20 分間殺菌した。コニディオボラス・ヘテロスポラス (*Conidiobolus heterosporus*) CBS 138.57、フィチウム・イレグラレ (*Pythium irregulare*) CBS 494.86、フィトフトラ・インフェスタンス (*Phytophthora infestans*) IPO

4872、コニディオボラス・スロモボイデス (*Conidiobolus thromboides*) CBS 183.60、ペニシリウム・シアネウム (*Penicillium cyaneum*) IFO 5337、クラドスポリウム・ヘルブラム (*Cladosporium herbarum*) IFO 30314、ムコール・アンビガス (*Mucor ambiguous*) IFO 6742、アルベルギルス・カンディダス (*Aspergillus candidus*) IFO 8816、ロードトルラ・グラチニス (*Rhodotorula glutinis*) IFO 0695、フザリウム・オキソボラム (*Fusarium oxysporum*) IFO 5942、クラドスポリウム・スファエロペルムム (*Cladosporium sphaerospermum*) IFO 6377 又は エントモフトラ・イグノビリス (*Entomophthora ignobilis*) CBS 181.60 を 2 種類の培地にそれぞれ 1 白金耳に接種し、レシプロシェーカー (110rpm) により 28℃ で 7 日間振盪培養した。実施例 1 と同様に濾過、水洗、乾燥、加水分解、メチルエステル化及び抽出を行い、得られた脂肪酸メチルエステルがガスクロマトグラフィーで分析した結果を第 3 表に示す。アラキドン

酸生産菌に胡麻油を添加することによりビスホモ-γ-リノレン酸の生産増加が認められた。

第 3 表

アラキドン酸生産菌の培地当たりのビスホモ-γ-リノレン酸生産量

	胡麻油添加	
	無し	有り
コニディオボラス・ヘテロスポラス	40.7(mg/l)	520.1(mg/l)
フィチウム・イレグラレ	12.3	56.3
フィトフトラ・インフェスタンス	10.2	93.4
コニディオボラス・スロモボイデス	14.1	77.1
ヘニシリウム・シアネウム	7.8	19.3
クラドスポリウム・ヘルブラム	3.0	12.3
ムコール・アンビガス	3.6	11.4
アスベルギルス・カンディダス	7.4	22.1
ロードトルラ・グラチニス	4.3	17.3
フザリウム・オキソボラム	4.4	21.4
クラドスポリウム・スファエロペルムム	5.1	19.4
エントモフトラ・イグノビリス	8.3	24.1

実施例 6

グルコース 4 % 及び酵母エキス 1 % を含む培地 (pH 6.0) 4 ml を 20 ml のエルレンマイヤーフラスコに入れ、120℃ で 20 分間殺菌した。モルティエラ・アルビナ IFO 8568 の胞子液 200 μl をそれぞれの培地に加え、レシプロシェーカー (110 rpm) により 28℃ で 2 日間振盪培養した後、胡麻油 80 mg (2 %) を加え、さらに 6 日間培養した。培養後、濾過により菌体を回収し、十分水洗した後、遠心エバポレーター (60℃、2 時間) で乾燥させ、実施例 1 と同様に加水分解、メチルエステル化、抽出を行い、得られた脂肪酸メチルエステルをガスクロマトグラフィーで分析したところ、ビスホモ-γ-リノレン酸メチルの生成量は、培地あたり、1.6 g / l であった。

実施例 7

胡麻油 20 g をアセトン 150 ml に溶かし、80℃ で一晩放置した。その結果油成分が沈殿となり、濾過により得た濾液からロータリーエバポレーターで有機溶媒を留去しアセトン可溶成分 A を得た。

又、沈殿からロータリーエバポレーターで含まれる有機溶媒を留去して油を得た。成分Aの容量は油の容量の50分の1であった。

グルコース4%、酵母エキス1%及び胡麻油0.05, 1, 2又は3%を含む培地(pH6.0)、並びにグルコース4%、酵母エキス1%及びアセトン処理により得た油0.05, 1, 2又は3%を含む培地(pH6.0)、並びにグルコース4%、酵母エキス1%及び成分A 0.01, 0.2又は0.5mgを含む培地(pH6.0) 2mlを10mlのエrlenmeyerフラスコに入れ、120℃で20分間殺菌した。モルティエラ・アルビナIFO 8568の孢子液 100μlをそれぞれの培地に加え、レシプロシェーカー(110rpm)により28℃で8日間振盪培養した。培養後、濾過により菌体を回収し、十分水洗した後遠心エバポレーター(60℃、2時間)で乾燥させ、そして、塩化メチレン2ml、無水メタノール-塩酸(10%) 2mlを加え、50℃で3時間処理することによってメチルエステル化し、n-ヘキサン4ml水1mlを加え、2回抽出し

溶媒を遠心エバポレーター(40℃、1時間)で留去した後、得られた脂肪酸メチルエステルをガスクロマトグラフィーで分析した。この結果を第2図に示す。

実施例8

逆相カラム(5C₁₈)、溶離液にメタノール水(60:40)を使って、実施例7で得られた成分A 20mgを高速液体クロマトグラフィーで分取した所、ビスホモ-γ-リノレン酸の生産に作用するいくつかのフラクションが得られた。そのひとつの溶媒を留去し、得られた結晶をさらにエタノールで再結晶化したものを質量分析、NMR等によりセサミン、2,6-ビス-(3,4-メチレンジオキシフェニル)-シス-3,7-ジオキサビシクロ[3,3,0]オクタンであると同定した。先の分取したセサミンフラクションを遠心エバポレーターで溶媒を留去した後、クロロホルム 200μlに再溶解しセサミン溶液とした。

グルコース4%、酵母エキス1%及びセサミンの0.4%クロロホルム溶液0, 5, 10, 20, 35,

50μlを含む培地(pH6.0) 2mlを10mlのエrlenmeyerフラスコに入れ、120℃で20分間殺菌した。モルティエラ・アルビナIFO 8568の孢子液100μlをそれぞれの培地に加え、レシプロシェーカー(110rpm)により28℃で8日間振盪培養した。培養後、実施例1と同様に濾過、水洗、乾燥、加水分解、メチルエステル化及び抽出を行い、得られた脂肪酸メチルエステルをガスクロマトグラフィーで分析した。第3図にその結果を示す。セサミン溶液が増すとアラキドン酸の生産が押えられ、前駆体のビスホモ-γ-リノレン酸が大量に生産することが認められた。

実施例9

グルコース4%及び酵母エキス1%を含む培地(pH6.0) 2mlを10mlのエrlenmeyerフラスコに入れ、120℃で20分間殺菌した。モルティエラ・アルビナIFO 8568の孢子液 100μlをそれぞれの培地に加え、レシプロシェーカー(110rpm)により28℃で2日間振盪培養した後、実施例2で用いたセサミン溶液50μlを加え、さらに

6日間培養した。培養後、実施例1と同様に濾過、水洗、乾燥、加水分解、メチルエステル化及び抽出を行い、得られた脂肪酸メチルエステルをガスクロマトグラフィーで分析したところ、ビスホモ-γ-リノレン酸の生成量は、培地あたり、1.5g/lであった。

実施例10

グルコース4%、酵母エキス1%及び実施例2で用いたセサミン溶液50μlを含む培地(pH6.0)並びにグルコース4%及び酵母エキス1%を含む培地(pH6.0) 2mlを10mlのエrlenmeyerフラスコに入れ、120℃で20分間殺菌した。コニディオボラス・ヘテロスポラス(*Conidiobolus heterosporus*) CBS 138.57、フィチウム・イレグラレ(*Pythium irregulare*) CBS 494.86、フィトフトラ・インフェスタンス(*Phytophthora infestans*) IFO 4872、ペニシリウム・シアネウム(*Penicillium cyaneum*) IFO 5337、クラドスポリウム・ヘルブラム(*Cladosporium herbarum*) IFO 30314、ムコール・アンビガス

第 4 表

(*Mucor ambiguus*) IF0 6742、アスペルギルス・カンディダス (*Aspergillus candidus*) IF0 8816、ロードトルラ・グラチニス (*Rhodotorula glutinis*) IF0 0695、フザリウム・オキシボラム (*Fusarium oxysporum*) IF0 5942、及びエントモフトラ・イグノビリス (*Entomophthora ignobilis*) CBC 181.60を2種類の培地にそれぞれ1白金耳を接種し、レシプロシェーカー (110rpm) により28℃で7日間振盪培養した。実施例1と同様に濾過、水洗、乾燥、加水分解、メチルエステル化及び抽出を行い、得られた脂肪酸メチルエステルをガスクロマトグラフィーで分析した結果を第4表に示す。アラキドン酸生産菌にセサミンを添加することによりビスホモ-γ-リノレン酸の生産増加が認められた。

以下余白

生 産 菌	セサミン添加	
	無 し	有 り
コニディオボラス・ヘテロスポラス	38.9(mg/l)	460.3(mg/l)
フィチウム・イレグラレ	10.6	63.2
フィトフトラ・インフェスタンス	11.7	72.4
ベニシリウム・シアネウム	7.5	21.1
クラドスポリウム・ヘルブラム	3.0	14.8
ムコール・アンビガス	3.2	10.2
アスペルギルス・カンディダス	6.9	24.9
ロードトルラ・グラチニス	3.7	17.7
フザリウム・オキシボラム	4.4	18.6
エントモフトラ・イグノビリス	7.7	21.3

実施例11

実施例2で得たビスホモ-γ-リノレン酸の生産に使用するセサミン以外のいくつかのフラクションの溶媒を留去し、得られた結晶をさらにエタノールで再結晶化したものを質量分析・NMR等

により同定した結果、セサミノール：2-(3, 4-メチレンジオキシ-6-ヒドロキシフェニル)-6-(3, 4-メチレンジオキシフェニル)-シス-3, 7-ジオキシビシクロ[3, 3, 0]オクタン、エピセサミノール及びエピセサミンであることが確かめられた。分取したセサミノール、エピセサミノール、エピセサミンのフラクションを遠心エバポレーターで溶媒を留去した後、クロロホルム 200μlに再溶解しセサミノール、エピセサミノール、エピセサミン溶液とした。

グルコース4%、酵母エキス1%及びセサミノール、エピセサミノール又はエピセサミンの0.4%クロロホルム溶液50μlを含む培地 (pH 6.0) 2mlを10mlのエrlenmeyerフラスコに入れ、120℃で20分間殺菌した。モルティエラ・アルピナ IF0 8568の胞子液 100μlをそれぞれの培地に加え、レシプロシェーカー (110rpm) により28℃で8日間振盪培養した。培養後、実施例1と同様に濾過、水洗、乾燥、加水分解、メチルエステル化及び抽出を行い、得られた脂肪酸メチル

エステルをガスクロマトグラフィーで分析した。セサミノール、エピセサミノール、エピセサミン溶液の添加によりビスホモ-γ-リノレン酸が大量に生産することが認められ、培地当りの生産量はそれぞれ0.86, 0.71, 0.81g/lであった。

実施例12

香辛料であるタラゴン (Tarragon)、イノンド種子 (Dill Seed)、パセリ (Parsley)、ウコン (Turmeric)、ナツメグ (Nutmeg) 各々 0.5 g に 5 ml のジクロロメタンを添加し、乳鉢材中で磨砕、抽出を行なった後、遠心分離にかけて、上清を集め、溶媒をエバポレーターで留去し、抽出物を得た。

上記の抽出物を4mlのエタノールに溶解した溶液、あるいは、ウラシル、シトシン、アデニン、グアニン、ヒポキサンチンの各4mg/ml水溶液を、実施例1の基本培地 (グルコース4%、酵母エキス1%、pH 6.0) 10ml (試験管中) にそれぞれ滅菌濾過後50μlずつ添加し、これにモルティエラ・アルピナ IF0 8568の胞子液 100μlを植菌し、28℃で6日間振盪培養 (300rpm) して得られた菌

第 2 表

体について実施例1に従ってそれぞれの培地当りのビスホモ-γ-リノレン酸生産量を求めたところ、タラゴン(Tarragon)抽出物添加では0.55 g/ℓ、イノンド種子(Dill Seed)抽出物添加では0.43 g/ℓ、パセリ(Parsley)抽出物添加では0.37 g/ℓ、ウコン(Turmeric)抽出物添加では0.75 g/ℓ、ナツメグ(Nutmeg)抽出物添加では0.45 g/ℓ、ウラシル添加では0.25 g/ℓ、シトシン添加では0.22 g/ℓ、アデニン添加では0.35 g/ℓ、グアニン添加では0.27 g/ℓ、ヒポキサンチン添加物では0.25 g/ℓであった。又、同時に比較のために、これら添加物を加えなかった対照区の培地当りのビスホモ-γ-リノレン酸生産量は0.18 g/ℓであった。

実施例13

ウコン(Turmeric)について、実施例6で用いた培地に、実施例4に従って種々の菌を植菌し、ビスホモ-γ-リノレン酸生産における添加効果を調べた。結果を第2表に示す。

生 産 菌	ウコン(Turmeric)抽出物添加	
	無 し	有 り
コニディオボラス・ヘテロスボラス	40.3(mg/l)	250.3(mg/l)
フィチウム・イレグラレ	9.7	25.4
フィトトラ・インフェスタンス	10.8	32.7
ベニシリウム・シアネウム	7.6	15.4
クラドスポリウム・ヘルブラム	2.3	8.8
ムコール・アンビガス	3.5	12.9
アスペルギルス・カンディダス	8.9	20.5
ロードトリラ・グラチニス	3.4	6.5
フザリウム・オキソボラム	4.0	7.7

実施例14

ビスホモ-γ-リノレン酸の生産に関与する化合物を胡麻油より見出したが、他のリゲナン類化合物として、胡麻油の粗製品からセサモリン(化合物A)、又胡麻種子のアセトン抽出物から2-(3,4-メチレンジオキシフェニル)-6-

(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニル)-3,7-ジオキサビシクロ(3,3,0)オクタン(化合物B)、2,6-ビス-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニル)-3,7-ジオキサビシクロ(3,3,0)オクタン(化合物C)、2-(3,4-メチレンジオキシフェニル)-6-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェノキシ)-3,7-ジオキサビシクロ(3,3,0)オクタン(化合物D)が知られており、実施例8及び11に記載したのと同様にしてこれらを高速液体クロマトグラフィーで分取し、各化合物を得た。

グルコース4%、酵母エキス1%、及び化合物A、化合物B、化合物C又は化合物Dのいずれか0.01%を含む培地(pH6.0)2mlを10mlのエrlenmeyerフラスコに入れ、120℃で20分間殺菌した。モルティエラ・アルビナIFO 8568の胞子液100μlをそれぞれの培地に加え、レシプロシェーカー(110rpm)により28℃で8時間振盪培養した。培養後、実施例1と同様に濾過、水洗、乾燥、加水分解、メチルエステル化及び抽出を行

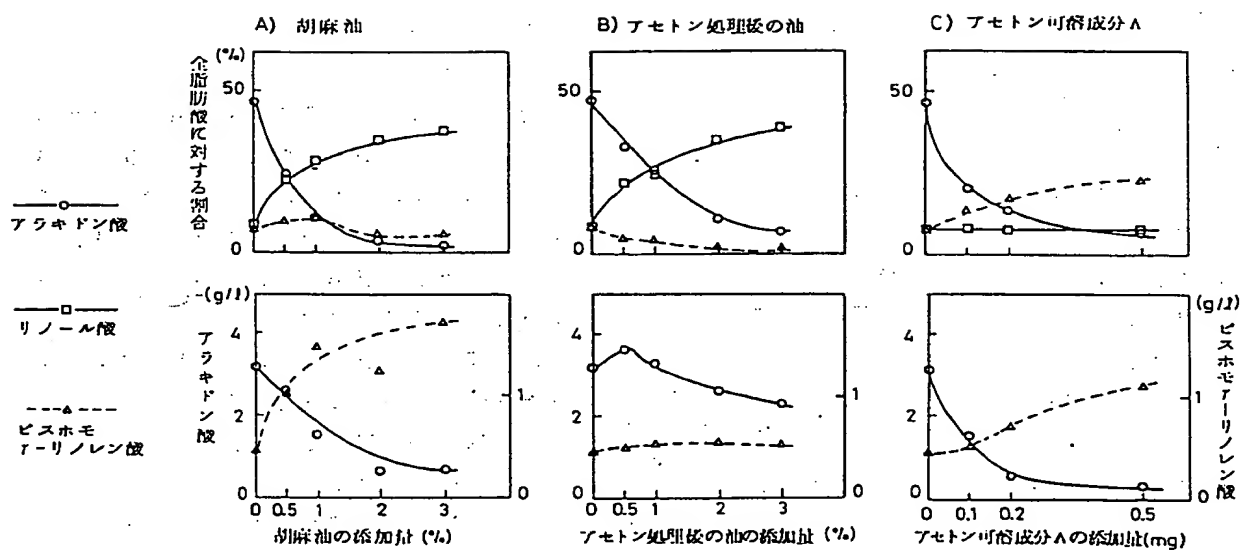
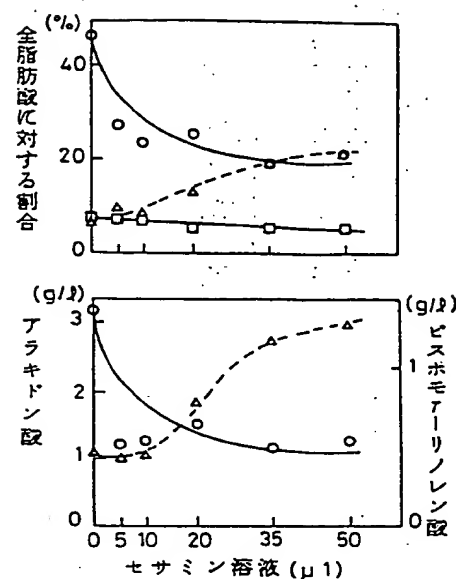
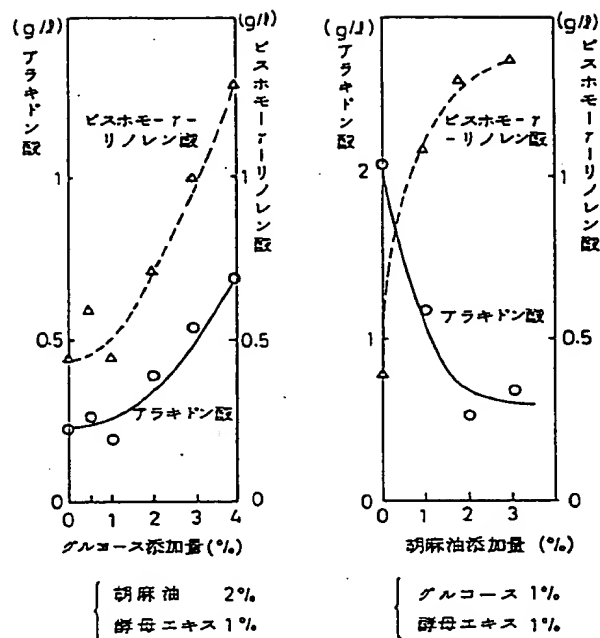
い、得られた脂肪酸メチルエステルをガスクロマトグラフィーで分析した。化合物A、B、C、又はDの添加によりビスホモ-γ-リノレン酸が大量に生産することが認められ、培地当りの生産量はそれぞれ0.74、0.63、0.59、0.66 g/ℓであった。又、同様の骨格をもつハエドキサン関連化合物も同様の活性を示すのも明らかである。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、培地中のグルコース量又は胡麻油量を変えた場合のアラキドン酸及びビスホモ-γ-リノレン酸の生産量の変化を示すグラフである。

第2図は、各種胡麻油処理画分の添加量と各種脂肪酸の生産量との関係を示すグラフである。

第3図は、セサミンの添加量とアラキドン酸及びビスホモ-γ-リノレン酸の生産量との関係を示すグラフである。



第1頁の続き

⑨Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

//(C 12 P 7/40
 C 12 R 1:645)
 (C 12 P 7/40
 C 12 R 1:66)
 (C 12 P 7/40
 C 12 R 1:77)
 (C 12 P 7/40
 C 12 R 1:785)
 (C 12 P 7/40
 C 12 R 1:80)

6712-4B

手続補正書(自発)

平成 / 年 2 月 8 日
~~昭和63年~~

特許庁長官 吉田文毅殿

1. 事件の表示

昭和63年特許願第053642号

2. 発明の名称

ビスホモ-γ-リノレン酸及びこれを
 含有する脂質の製造方法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 (190)サントリー株式会社

4. 代理人

住所 〒105 東京都港区虎ノ門一丁目8番10号

静光虎ノ門ビル 電話 504-0721

氏名 弁理士(6579)青木 朗

方式
 左 (外4名)

5. 補正の対象

- (1) 明細書の「特許請求の範囲」の欄
- (2) 明細書の「発明の詳細な説明」の欄
- (3) 図面

6. 補正の内容

- (1) 特許請求の範囲を別紙の通りに補正します。
- (2)① 明細書第14頁第4行目、第14頁第9行目、第14頁第17行目、及び第15頁第2行目「抽出液」を「抽出物」に補正します。
- ② 同第20頁第19行目「10-」を「10-重量%」に補正します。
- ③ 同第20頁第20行目「サセミノール」を「セサミノール」に補正します。
- ④ 同第32頁第11行目「oxysporum」を「oxysporum」に補正します。
- ⑤ 同第33頁第3表中、下から8行目「ヘニシリューム」を「ベニシリューム」に補正します。
- ⑥ 同第33頁第3表中、下から7行目「ヘルブラム」を「ヘルブラム」に補正します。
- ⑦ 同第36頁第6行目「メタノール水」を

「メタノール-水」に補正します。

⑧ 同第37頁第20行目「例2」を「例8」に補正します。

⑨ 同第38頁第8行目「実施例2」を「実施例8」に補正します。

⑩ 同第38頁第17行目「4872ペニシリウム」を「4872、ペニシリウム」に補正します。

⑪ 同第40頁下から4行目「実施例2」を「実施例8」に補正します。

⑫ 同第41頁第4行目「ジオキシビシクロ」を「ジオキサビシクロ」に補正します。

⑬ 同第42頁第16行目「実施例1」を「実施例7」に補正します。

⑭ 同第44頁下から4行目「リゲナン」を「リグナン」に補正します。

⑮ 同第45頁第18行目「8時間」を「8日間」に補正します。

⑯ 同第46頁4行目「生産料」を「生産量」に補正します。

(3) 第1図を別紙の通りに補正します。

7. 添付書類の目録

(1) 特許請求の範囲

1 通

(2) 第1図

1 通

2. 特許請求の範囲

1. アラキドン酸生産能を有する微生物を胡麻油及び／又は落花生油を添加した培地で培養するか、あるいは該微生物が培養されている培養液に胡麻油及び／又は落花生油を添加してさらに培養することによりビスホモ-γ-リノレン酸又はビスホモ-γ-リノレン酸を含有する脂質を生成せしめ、そしてビスホモ-γ-リノレン酸を採取することを特徴とするビスホモ-γ-リノレン酸の製造方法。

2. アラキドン酸生産能を有する微生物を胡麻油及び／又は落花生油を添加した培地で培養するか、あるいは該微生物が培養されている培養液に胡麻油及び／又は落花生油を添加してさらに培養し、そしてビスホモ-γ-リノレン酸を含有する脂質を採取することを特徴とするビスホモ-γ-リノレン酸を含有する脂質の製造方法。

3. 胡麻油に対して実質的に非混和性である有機溶剤により胡麻油から抽出した抽出物又は胡麻種子の溶剤抽出物を添加した培地でアラキドン酸

生産能を有する微生物を培養するか、あるいは該微生物が培養されている培養液に前記抽出物を添加してさらに培養することによりビスホモ-γ-リノレン酸又はビスホモ-γ-リノレン酸を含有する脂質を生成せしめ、そしてビスホモ-γ-リノレン酸を採取することを特徴とするビスホモ-γ-リノレン酸の製造方法。

4. 胡麻油に対して実質的に非混和性である有機溶剤により胡麻油から抽出した抽出物又は胡麻種子の溶剤抽出物を添加した培地でアラキドン酸生産能を有する微生物を培養するか、あるいは該微生物が培養されている培養液に前記抽出物を添加してさらに培養し、そしてビスホモ-γ-リノレン酸を含有する脂質を採取することを特徴とするビスホモ-γ-リノレン酸を含有する脂質の製造方法。

5. アラキドン酸生産能を有する微生物をセサミン、セサミノール、エピセサミン、エピセサミノール、セサモリン、2-(3,4-メチレンジオキシフェニル)-6-(3-メトキシ-4-ヒ

ドロキシフェニル) - 3, 7-ジオキサビシクロ (3, 3, 0) オクタン、2, 6-ビス-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニル) - 3, 7-ジオキサビシクロ (3, 3, 0) オクタン、又は 2-(3, 4-メチレンジオキシフェニル) - 6-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェノキシ) - 3, 7-ジオキサビシクロ (3, 3, 0) オクタンを単独で又は組み合わせて添加した培地で培養するか、あるいは該微生物が培養されている培養液にセサミン、セサミノール、エビセサミン、エビセサミノール、セサモリン、2-(3, 4-メチレンジオキシフェニル) - 6-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニル) - 3, 7-ジオキサビシクロ (3, 3, 0) オクタン、又は 2-(3, 4-メチレンジオキシフェニル) - 6-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェノキシ) - 3, 7-ジオキサビシクロ (3, 3, 0) オクタンを単独で又は組み合わせて添加して

メチレンジオキシフェニル) - 6-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニル) - 3, 7-ジオキサビシクロ (3, 3, 0) オクタン、2, 6-ビス-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニル) - 3, 7-ジオキサビシクロ (3, 3, 0) オクタン、又は 2-(3, 4-メチレンジオキシフェニル) - 6-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェノキシ) - 3, 7-ジオキサビシクロ (3, 3, 0) オクタンを単独で又は組み合わせて添加してさらに培養し、そしてビスホモ-γ-リノレン酸を含有する脂質を採取することを特徴とするビスホモ-γ-リノレン酸を含有する脂質の製造方法。

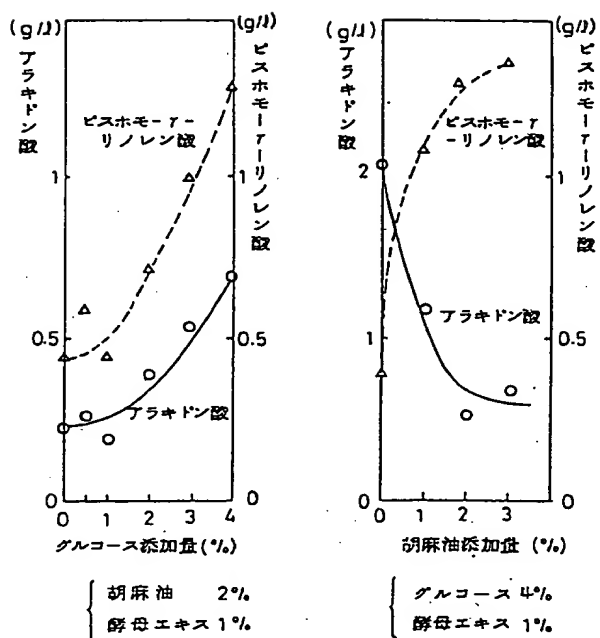
7. アラキドン酸生産能を有する微生物をタラゴン (Tarragon)、イノンド種子 (Dill Seed)、パセリ (Parsley)、ウコン (Turmeric)、又はナツメグ (Nutmeg) の抽出物を単独で又は組み合わせて添加した培地で培養するか、あるいは該微生物が培養されている培養液にタラゴン (Tarragon)、イノンド種子 (Dill Seed)、パセリ (Parsley)、ウコン (Turmeric)、又はナツメグ (Nutmeg) の

さらに培養することによりビスホモ-γ-リノレン酸又はビスホモ-γ-リノレン酸を含有する脂質を生成せしめ、そしてビスホモ-γ-リノレン酸を採取することを特徴とするビスホモ-γ-リノレン酸の製造方法。

6. アラキドン酸生産能を有する微生物をセサミン、セサミノール、エビセサミン、エビセサミノール、セサモリン、2-(3, 4-メチレンジオキシフェニル) - 6-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニル) - 3, 7-ジオキサビシクロ (3, 3, 0) オクタン、2, 6-ビス-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニル) - 3, 7-ジオキサビシクロ (3, 3, 0) オクタン、又は 2-(3, 4-メチレンジオキシフェニル) - 6-(3-メトキシ-4-ヒドロキシフェノキシ) - 3, 7-ジオキサビシクロ (3, 3, 0) オクタンを単独で又は組み合わせて添加した培地で培養するか、あるいは該微生物が培養されている培養液にセサミン、セサミノール、エビセサミン、エビセサミノール、セサモリン、2-(3, 4-

抽出物を単独で又は組み合わせて添加してさらに培養することによりビスホモ-γ-リノレン酸又はビスホモ-γ-リノレン酸を含有する脂質を生成せしめ、そしてビスホモ-γ-リノレン酸を採取することを特徴とするビスホモ-γ-リノレン酸の製造方法。

8. アラキドン酸生産能を有する微生物をタラゴン (Tarragon)、イノンド種子 (Dill Seed)、パセリ (Parsley)、ウコン (Turmeric)、又はナツメグ (Nutmeg) の抽出物を単独で又は組み合わせて添加した培地で培養するか、あるいは該微生物が培養されている培養液にタラゴン (Tarragon)、イノンド種子 (Dill Seed)、パセリ (Parsley)、ウコン (Turmeric)、又はナツメグ (Nutmeg) の抽出物を単独で又は組み合わせて添加してさらに培養し、そしてビスホモ-γ-リノレン酸を含有する脂質を採取することを特徴とするビスホモ-γ-リノレン酸を含有する脂質の製造方法。



第 1 図